

S/N 09/981070

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Gabriel FESTOC

Examiner:

Unknown

Serial No.: 09/981070

Group Art Unit:

1645

Filed: October 15, 2001

Docket No.:

8076.231USW1

Title:

MAR 25 2002

DEVICE FOR THERMO-DEPENDENT CHAIN REACTION

AMPLIFICATION OF TARGET NUCLEIC ACID SEQUENCES, MEASURED

IN REAL-TIME

CERTIFICATE UNDER 37 CFR 1.8: The undersigned hereby certifies that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service, as first class mail, with sufficient postage, in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231, on March 12, 2002.

By: Peggy Kerkhove
Name: Peggy Kerkhove

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Applicants enclose herewith one certified copy of a French application, Serial No.

01/10029, filed July 28, 2000, the right of priority of which is claimed under 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

MERCHANT & GOULD P.C.

P.O. Box 2903

Minneapolis, Minnesota 55402-0903

(612) 332-5300

Dated: March 12, 2002

By: Katherine M. Kowalchuk
Katherine M. Kowalchuk
Reg. No. 36,848

KMK/pjk

RECEIVED

MAR 28 2002

TECH CENTER 1600/2900

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 28 JUIL 2000 LIEU 35 INPI RENNES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0010029 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 28 JUIL 2000		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE ERNEST GUTMANN-YVES Plummerand 3 Rue CHAUVEAU LAGARDE 75008 PARIS	
V s réf'rences pour ce dossier (facultatif) 6389		RECEIVED MAR 28 2002 TECH CENTER 1600/2900	
C nfirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE			
Cochez l'une des 4 cases suivantes			
Demande de brevet	<input checked="" type="checkbox"/>		
Demande de certificat d'utilité	<input type="checkbox"/>		
Demande divisionnaire	<input type="checkbox"/>		
Demande de brevet initiale	N°	Date	/ /
ou demande de certificat d'utilité initiale	N°	Date	/ /
Transformation d'une demande de brevet européen	<input type="checkbox"/>	Date	/ /
Demande de brevet initiale	N°	Date	/ /
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Système d'amplification en chaîne par polymérase de séquences nucléiques cibles			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		FESTOC	
Prénoms		Gabriel	
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	11 Place du parlement de Bretagne	
	Code postal et ville	35000 RENNES	
Pays		FRANCE	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE 28 JUIL 2000 LIEU 35 INPI RENNES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0010028		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 260899
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		6389	
6 MANDATAIRE			
Nom		VIDON	
Prénom		Patrice	
Cabinet ou Société		Cabinet VIDON	
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		92-1250	
Adresse	Rue	Centre d'affaires Le Nobel - Technopole Atalante	
	Code postal et ville	2, allée Antoine Becquerel BP 90333	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		35703 RENNES Cedex 7	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		02 99 38 23 00	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		02 99 36 02 00	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformati n)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <i>suivra</i> <input checked="" type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>):	
Si v us avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (N m et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE RENNES	

Système d'amplification en chaîne par polymérase de séquences nucléiques cibles.

La présente invention concerne le domaine de la génétique.

Plus précisément, la présente invention concerne un système d'amplification en chaîne par polymérase de séquences nucléiques cibles et un dispositif pour la mise en œuvre dudit procédé.

La présente invention trouve de nombreuses applications, notamment dans le cadre des procédés de diagnostic basés sur la détection des acides nucléiques.

De tels procédés de diagnostic basés sur les acides nucléiques, bien que faisant quasi systématiquement intervenir une réaction d'hybridation moléculaire entre une séquence nucléique cible et une ou plusieurs séquences nucléiques complémentaires de ladite séquence cible, présentent de nombreuses variantes comme les techniques connues de l'homme de métier sous les expressions "techniques de transfert (blot, dot blot, Southern blot, Restriction Fragment Length Polymorphism, etc.)", ou encore comme les systèmes miniaturisés sur lesquels sont préfixées les séquences complémentaires des séquences cibles ("biopuces"). Dans le cadre de ces techniques, les séquences nucléiques complémentaires sont généralement appelées sondes. Une autre variante, qui peut constituer en soit la base d'un procédé de diagnostic ou n'être qu'une étape d'une autre variante (afin notamment d'augmenter la concentration de la séquence cible et donc la sensibilité du diagnostic) est l'Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP). Dans le cadre de cette dernière technique, très utilisée dans les laboratoires, les séquences nucléiques complémentaires des séquences cibles sont appelées amorces.

Les amplifications en chaîne par polymérase (ACP) impliquent une répétition de cycles, dont le nombre varie généralement de 20 à 50, et qui sont composés chacun de trois phases successives, à savoir ; dénaturation, hybridation, élongation. Respectivement, la première phase correspond à la transformation des acides nucléiques double brin (bicaténaires) en acides nucléiques monobrin (monocaténaire), la seconde phase à l'hybridation moléculaire entre la séquence cible et les amorces complémentaires de ladite séquence, et la troisième phase à

l'élongation des amorces complémentaires et hybridées à la séquence cible par une ADN polymérase. Ces phases sont menées à des températures spécifiques : généralement 94°C pour la dénaturation, 72°C pour l'élongation, et entre 30°C et 65°C pour l'hybridation selon la température d'hybridation (T_m) des amorces utilisées. Généralement, les ACP impliquent des volumes réactionnels allant de 2 à 50 μ l et sont effectuées dans des tubes, des microtubes, des capillaires ou des systèmes connus de l'homme de l'art sous le terme « microplaques » (en fait des ensembles de micro tubes solidarisés). Chaque lot de tubes ou de contenants équivalents doit donc être successivement porté à ces trois températures, et ce autant de fois que de cycles désirés.

L'utilisation de tubes ou de systèmes s'y approchant oblige l'utilisateur à effectuer de multiples manipulations pour préparer autant de tubes et de solutions (connues de l'homme de l'art sous l'expression "mix PCR") que de séquences cibles qu'il souhaite amplifier même à partir d'un échantillon unique d'acides nucléiques, à l'exception des procédés d'amplification "multiplex", qui permettent l'amplification de plusieurs séquences cibles simultanément dans le même contenant, soit par l'utilisation d'amorces dites peu spécifiques qui peuvent s'hybrider avec plusieurs séquences cibles comme par exemple la technique RAPD – Random Amplified Polymorphism DNA, soit par l'utilisation d'amorces spécifiques mais en nombre plus important, chaque couple d'amorces utilisé permettant l'amplification d'une séquence cible. Ces amplifications multiplex correspondent à des cas particuliers et ne sont pas la norme. De surcroît, elles ne garantissent pas l'absence d'interactions d'une réaction d'amplification sur une autre, et pour des raisons notamment de possibles hybridations entre les amorces, ne peuvent qu'être très limitées dans le nombre de séquences cibles amplifiées par contenant.

Ces différentes manipulations impliquent de nombreux inconvénients.

En premier lieu, elles sont consommatrices de temps. En second lieu, elles ne sont pas sans risques du point de vue des éventuelles contaminations d'un tube à l'autre ou depuis l'environnement extérieur (poussière, bactérie ou tout autre

contaminant susceptible de contenir des molécules d'acides nucléiques). De plus, elles n'assurent pas une homogénéité de volume et de concentration en réactifs d'un tube à l'autre. Enfin, elles imposent l'utilisation de volumes manipulables manuellement, généralement supérieurs à $1\mu\text{l}$, ce qui a une incidence sur les coûts liés à la réalisation des ACP, les réactifs utilisés étant chers.

L'utilisation de dispositifs conçus pour automatiser au moins partiellement de telles manipulations permet de pallier certains de ces inconvénients. Toutefois, de tels automates sont relativement chers et leur utilisation ne se trouve donc généralement économiquement justifiée que dans le cas des ACP en grandes séries, par exemple pour le séquençage des génomes.

Il existe donc aujourd'hui un besoin pour un système d'amplification en chaîne par polymérase qui ne présente pas les inconvénients cités ci-dessus de l'état de la technique.

L'objectif de la présente invention est de proposer un tel système qui permette de diminuer considérablement le nombre de manipulations nécessaires à la mise en œuvre de l'ACP sur une pluralité de séquences cibles et, en conséquence, de diminuer le temps nécessaire à cette opération.

Un autre objectif de la présente invention est de proposer un tel système qui minimise les risques de contamination d'un contenant à l'autre.

Un autre objectif de la présente invention est de proposer un tel système qui réduise les volumes de réactifs mis en jeu et donc les coûts.

Un autre objectif de la présente invention est de proposer un tel système qui optimise une répartition homogène en volume et en concentration des réactifs nécessaires à l'ACP dans les contenants.

Ces différents objectifs sont atteints grâce à l'invention qui concerne tout système d'amplification en chaîne par polymérase de séquences nucléiques cibles caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins une plaque présentant une pluralité de chambres réactionnelles ; et,

- au moins une platine de chauffage présentant trois zones distinctes pouvant être portées à trois températures différentes, correspondant aux trois phases des cycles d'amplification en chaîne par polymérase (ACP).

Un tel système selon l'invention est moins complexe que les systèmes de l'art antérieur, dans la mesure où les trois températures nécessaires aux cycles de l'ACP sont assurées par trois zones distinctes de températures constantes et non par une platine dont on doit faire varier la température.

Il pourra être envisagé différentes variantes du système. Selon une variante préférentielle de l'invention, le système comprend :

- au moins une plaque présentant au moins un réservoir destiné à recevoir un fluide composé de l'échantillon d'acides nucléiques à analyser et des réactifs nécessaires à une réaction d'amplification en chaîne à l'exception des amorces, une pluralité de chambres réactionnelles dans lesquelles sont pré-réparties des amorces spécifiques de séquences cibles à amplifier, et des canaux reliant ledit réservoir auxdites chambres réactionnelles ;

- au moins une platine de chauffage présentant trois zones distinctes pouvant être portées à trois températures différentes correspondant aux trois phases des cycles d'ACP;
- des moyens de déplacement relatifs entre ladite plaque et ladite platine.

Selon cette variante préférentielle, il est possible de distribuer, à partir d'un réservoir, un fluide contenant un échantillon d'acides nucléiques à analyser et les réactifs nécessaires à l'ACP dans une pluralité de chambres réactionnelles contenant des amorces spécifiques de séquences cibles d'acides nucléiques à amplifier, et à autoriser le processus d'amplification en soumettant le contenu des chambres successivement à trois températures distinctes (à savoir celles nécessaires à la dénaturation, l'hybridation et l'élongation) une multitude de fois grâce à un mouvement relatif entre la plaque incluant lesdites chambres réactionnelles et ladite platine de chauffage présentant trois zones distinctes pouvant être portées à trois températures différentes.

Le système selon cette variante préférentielle présente l'avantage d'autoriser un remplissage concomitant de toutes les chambres réactionnelles, ce qui diminue le

temps de préparation et les risques de contamination d'une chambre à l'autre. Le système selon cette variante préférentielle présente également l'avantage de pouvoir être miniaturisé et d'impliquer l'utilisation de volumes de réactifs plus faibles que dans l'état de la technique. Enfin on notera aussi que, grâce à la platine de chauffage spécifique qu'elle préconise, l'invention permet d'accélérer les cycles d'ACP, puisqu'il n'est pas nécessaire pour effectuer les différentes phases (dénaturation, hybridation, élongation) de faire varier la température de la platine chauffante ou de l'atmosphère comme dans l'état de la technique, le mouvement relatif entre la plaque et la platine permettant de soumettre rapidement et successivement le contenu de chacune des chambres réactionnelles à trois températures distinctes dédiées à chacune de ces phases.

On notera que la plaque du système selon l'invention pourra présenter de multiples formes. Toutefois, selon une variante préférentielle de l'invention cette plaque présente une forme circulaire, ledit réservoir étant alors prévu sensiblement au centre de ladite plaque, lesdites chambres réactionnelles étant réparties en cercle autour dudit réservoir, et lesdits canaux reliant ledit réservoir aux dites chambres étant prévus essentiellement radialement. Une telle architecture permet d'optimiser le remplissage des chambres réactionnelles à partir du réservoir central.

Egalement préférentiellement, lesdites chambres réactionnelles sont prévues relativement à la périphérie de ladite plaque. Ainsi, il est possible d'optimiser le nombre de chambres réactionnelles pouvant être prévues sur la plaque et remplies à partir du réservoir central.

Selon une variante de l'invention, un tel système comprend autant de canaux que de chambres réactionnelles. Toutefois, dans certains modes de réalisation on pourra prévoir des tronçons de canaux communs à plusieurs chambres réactionnelles.

Lorsque, comme décrit ci-dessus, la plaque du système selon l'invention est circulaire, lesdites zones distinctes de chauffage de ladite platine de chauffage sont réparties selon trois portions de disque. Chaque portion peut être chauffée à une température distincte pour porter successivement à trois températures distinctes le

contenu desdites chambres réactionnelles, grâce auxdits moyens de déplacement relatifs entre la plaque et la platine chauffante.

Au sujet de ces moyens de déplacement on notera que, selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, ladite platine fixe et ladite plaque est mue grâce auxdits moyens de déplacement.

Toutefois, dans d'autres modes de réalisation, on pourra également prévoir une plaque fixe et une platine de chauffage mise en mouvement grâce auxdits moyens de déplacement.

Dans le mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, selon lequel ladite plaque est circulaire, ces moyens de déplacement autorisent la mise en rotation de ladite plaque et/ou de ladite platine.

Les moyens d'amenée du fluide présent dans ledit réservoir vers lesdites chambres réactionnelles pourront être réalisés sous différentes formes. Selon une variante préférentielle de l'invention, il est préférable de distribuer sous pression le fluide contenu dans ce réservoir dans lesdites chambres réactionnelles de façon à permettre un remplissage uniforme de ces chambres. Préférentiellement, ces moyens d'amenée incluent donc un dispositif à piston dont la vitesse de pénétration dans le réservoir sera calculée pour favoriser le bon remplissage des chambres réactionnelles.

Le réservoir destiné à recevoir l'échantillon d'acides nucléiques et les réactifs nécessaires à l'ACP pourra présenter une capacité variable selon les modes de réalisation. Préférentiellement, il présentera une capacité comprise entre environ 0,1 ml et environ 1 ml.

Egalement préférentiellement, la plaque comprend entre environ 20 et environ 500 chambres réactionnelles.

Le volume de ces chambres pourra également varier selon les modes de réalisation. Avantageusement, ces chambres présentent un volume compris entre environ 1 μ l et 10 μ l.

Le diamètre des canaux sera quant à lui choisi suffisamment faible pour ne pas autoriser une distribution par gravité du fluide présent dans le réservoir dans

les chambres réactionnelles, ceci de façon à éviter un remplissage non reproductible de ces chambres. Ce diamètre sera ainsi préférentiellement inférieur ou égal à environ 0,2 mm. Au sujet de ce diamètre, on notera que la section des canaux sera préférentiellement circulaire mais qu'elle pourra être également de toute autre forme et notamment polygonal, le "diamètre" des canaux visant alors leur plus grande largeur en section.

La profondeur des chambres réactionnelles (par rapport aux canaux) pourra aussi varier en fonction des modes de réalisation de l'invention. Selon une variante préférentielle, ces chambres présentent une profondeur comprise entre environ 0,5 mm et 1,5 mm.

Comme indiqué ci-dessus, l'un des avantages de la présente invention est d'autoriser une miniaturisation du système qu'elle propose. Ainsi, avantageusement, ladite plaque présente un diamètre compris entre environ 1 et 10 cm.

On notera par ailleurs que l'épaisseur de ladite plaque dépendra de plusieurs facteurs et notamment du matériau la constituant. En pratique, cette plaque sera préférentiellement constituée en matière plastique et présentera une épaisseur comprise entre 0,5 et 5 mm.

On pourra prévoir un élément conducteur entre la plaque et la platine chauffante. Toutefois, selon une variante préférentielle de l'invention, ladite plaque est en contact direct avec ladite platine chauffante. Dans ce cas, ladite platine est avantageusement pourvue d'un revêtement favorisant le déplacement entre ladite plaque et ladite platine. Un tel revêtement pourra par exemple être constitué en Téflon (marque déposée).

Afin de faciliter les échanges thermiques entre le contenu desdites chambres réactionnelles et la platine, l'épaisseur du "plancher" de celles-ci devra être préférentiellement aussi faible que possible. Cette épaisseur dépendra du matériau utilisé pour réaliser la plaque. Préférentiellement, elle sera d'environ 0,2mm.

Les chambres, qui sont fermées, par exemple par une paroi supérieure en plastique transparent, sont pourvues d'évents, permettant à l'air qu'elles

contiennent de s'échapper lors de leur remplissage par le fluide provenant du réservoir.

Selon une variante préférentielle de l'invention, lesdites chambres réactionnelles contiennent chacune deux amorces spécifiques d'une séquence cible à amplifier et, facultativement, au moins une sonde marquée spécifique de ladite séquence.

Comme indiqué ci-dessus, la platine de chauffage du système présente trois zones pouvant être portées à trois températures distinctes. Préférentiellement, cette platine est constituée de trois blocs thermiques indépendants ("thermoblocs") distincts reliés à des moyens de programmation de leur température. Un de ces thermoblocs est chauffé à la température de dénaturation, le deuxième à la température d'hybridation, le troisième à la température d'élongation. L'utilisation de tels thermoblocs de température constante simplifie la réalisation de la platine chauffante.

Les moyens de déplacement relatif de la plaque par rapport à la platine pourront être réalisés sous de multiples formes. Selon une mode de réalisation ladite plaque présente au moins une oreille et lesdits moyens de déplacement incluent au moins un axe coopérant avec ladite oreille pour inculquer à ladite plaque un mouvement rotatif.

Avantageusement, le système selon l'invention comprend également des moyens optiques d'excitation/mesure de la fluorescence prévue au-dessus de ladite plaque. Selon une variante préférentielle de l'invention, ces moyens constitueront un système unique et fixe. C'est un avantage d'une variante préférentielle de l'invention selon laquelle la plaque est circulaire et mue selon un déplacement rotatif que de pouvoir amener successivement chaque chambre réactionnelle sous ledit système optique, réduisant sa complexité.

L'invention concerne également tout procédé d'amplification en chaîne par polymérase grâce à un système tel que décrit ci-dessus caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- remplir au moins partiellement le réservoir avec un fluide contenant un échantillon d'acides nucléiques à analyser ainsi que tout le nécessaire à une réaction d'amplification, à l'exception des amorces, et facultativement un intercalant fluorescent des acides nucléiques ;

5 - répartir ledit fluide dans lesdites chambres réactionnelles prévues dans ladite plaque dans lesquelles sont pré-réparties des amorces et, facultativement, une ou plusieurs sondes marquées spécifiques de la séquence nucléique cible ;

10 - mettre en œuvre lesdits moyens de déplacement relatifs entre la plaque et la platine chauffante pour amener successivement, et autant de fois que désiré, le contenu de chaque chambre aux trois températures définies par les trois zones de ladite platine de chauffage.

15 Le mode de déplacement relatif entre la platine et la plaque pourra varier selon les modes de réalisation. Il pourra s'agir d'un déplacement à vitesse continu ou par à-coups. La vitesse de déplacement pourra être constante ou varier dans le temps.

L'invention, ainsi que les différents avantages qu'elle présente, seront mieux compris grâce à la description qui va suivre d'un mode non limitatif de réalisation de celle-ci donné en référence aux dessins dans lesquels :

20 - la figure 1 représente une vue latérale d'un système selon la présente invention ;

- la figure 2 représente une vue supérieure de la platine chauffante ;

- la figure 3 représente une vue en perspective de la plaque pourvue des chambres réactionnelles et d'une partie des moyens de déplacement ;

25 - la figure 4 représente une vue en coupe de cette plaque selon la ligne AA.

30 Le système de détection et de quantification de séquences nucléiques cibles représentés à la figure 1 comprend une plaque 1 circulaire en matière plastique de 2mm d'épaisseur présentant un diamètre de 5 cm. Cette plaque 1 est pourvue d'un réservoir central 2 et sera décrite plus en détails en référence ci-après aux figures 3

et 4. La capacité du réservoir est, dans le cadre du présent mode de réalisation de 400 μ l. Son plancher est plat mais on notera que dans d'autres modes de réalisation il pourra être bombé pour faciliter le passage du fluide vers les chambres sans formation de bulles d'air, notamment en fin d'adressage lorsque le réservoir est
5 quasiment vide.

Le système comprend par ailleurs une platine chauffante 3 en contact direct avec la face inférieure de la plaque 1 et des moyens de déplacement 4 de la plaque 1 par rapport à la platine chauffante 3. Ces moyens de déplacement incluent un micromoteur 7 reliés à deux axes 5 qui coopèrent avec deux oreilles 6 de la
10 plaque 1 pour inculquer à celle-ci un mouvement rotatif sur la plaque chauffante 3, celle-ci restant quant à elle fixe.

Le système décrit comprend également un piston 8 destiné à coopérer avec ledit réservoir 2 ainsi qu'un dispositif optique 9 de d'excitation/mesure de fluorescence (source émettrice permettant une excitation à une longueur d'onde
15 donnée et programmable et récepteur de la fluorescence émise) fixe et placé au dessus de la plaque 1 et de la platine chauffante 3 .

Comme on peut le voir sur la figure 2, la platine chauffante 3 est constituée de trois blocs métalliques 3a,3b et 3c (ci-après dénommés thermoblocs) en forme de portions de disques. On notera que dans ce mode de réalisation, ces thermoblocs
20 présentent sensiblement la même taille mais que, dans d'autres modes de réalisation, ils pourront présenter une taille différente, la taille étant entendue comme la surface angulaire occupée en vue de dessus. Chaque thermobloc 3a,3b et 3c est conçu pour pouvoir être amené à une température constante et programmable, correspondant à l'une des phases (dénaturation, hybridation ou
25 élongation) des cycles d'amplification (ACP), soit généralement respectivement 94°C pour la dénaturation, 72°C pour l'élongation, et entre 30 et 65°C pour l'hybridation selon le Tm (température d'hybridation) des amorces utilisées. Les températures des thermoblocs pourront être contrôlées par tous moyens connus de l'homme de l'art.

En référence à la figure 3, la plaque 1 est pourvue d'un réservoir central 2 de capacité $400\mu\text{l}$ relié à 36 chambres réactionnelles 10 par autant de canaux 11, réparties uniformément sur toute la périphérie de la plaque (sur la figure 3, on n'a pas représenté l'ensemble des canaux et des chambres mais seulement certains d'entre eux). Ces chambres réactionnelles 10 sont par ailleurs pourvus d'évents 12 abouchant sur le bord de la plaque 1. Dans le présent mode de réalisation, les canaux présente un diamètre de 0,2 mm et le volume des chambres réactionnelles est de 2,5 microlitres. Dans d'autres modes de réalisation, ce diamètre et ce volume pourront bien sûr être différents.

Comme déjà précisé, cette plaque 1 est également pourvue de deux oreilles 6 percées chacune d'un orifice pour laisser passer un axe 5 relié au micromoteur 7.

Selon la figure 4, les chambres réactionnelles présentent une profondeur de 1 mm. Leur plancher présente une épaisseur de 0,2mm environ. Cette épaisseur est suffisamment faible pour faciliter de bons échanges thermiques entre les chambres 10 et les thermoblocs 3a,3b et 3c. Les chambres réactionnelles 10 sont fermées dans leur partie supérieure par une paroi 13 transparente, formant également la paroi du réservoir 2.

L'utilisation du système représenté est le suivant.

Le réservoir central 2 est destiné à recevoir l'échantillon d'acides nucléiques à analyser ainsi que tout le nécessaire à une réaction d'amplification et facultativement un intercalant fluorescent des acides nucléiques (l'ensemble sera dénommé ultérieurement fluide), à l'exception des amorces préréparties dans chaque chambre réactionnelle périphérique 10.

Dans le cadre du présent mode de réalisation, l'utilisateur placera dans le réservoir central $90\mu\text{l}$ (c'est-à-dire 36 fois $2,5\mu\text{l}$) de fluide dont 75 ng d'acides nucléiques. Les concentrations en réactifs dudit fluide sont les suivantes :

dNTP : 200 mM

Tampon Taq : 1 x

MgCl_2 : 1,5 mM

Taq : 4U

SybrGreen (marque déposée) : 1 x

H₂O : qsp

Chaque chambre 10, sauf quelques unes à des fins de témoins négatifs, contient deux amorces spécifiques d'une séquence cible à amplifier, et facultativement une ou plusieurs sondes marquées, permettant une mesure spécifique ultérieure de fluorescence. Dans le présent mode de réalisation, ont été répartis 10 ng de chaque amorce dans chaque chambre sauf dans celles servant de témoin négatif.

Après avoir rempli partiellement le réservoir 2 avec le fluide dont le volume est égal à la somme des volumes des chambres (le volume d'une chambre est défini comme étant le produit de sa surface de 'plancher' par sa profondeur) le piston 8 est actionné pour distribuer ce fluide dans la pluralité de chambres réactionnelles 10. Ce piston permet d'augmenter la pression au sein du réservoir 2 et permet le passage du fluide dans les canaux vers les chambres. La vitesse de déplacement du piston dans le réservoir est d'environ 1mm par seconde et ledit déplacement est stoppé à un niveau qui dépend du volume de fluide à adresser dans les chambres.

Le faible diamètre des canaux 11 permet d'empêcher la diffusion du fluide depuis le réservoir 2 vers les canaux 11 et les chambres 10 sous l'effet de la gravité (à cette échelle, les processus habituellement négligeables comme les forces de capillarité deviennent prégnants, et dans le cas présent suffisent à maintenir le fluide dans le réservoir). Grâce aux événements 12, l'air présent dans les chambres 10 est évacué ce qui assure le remplissage de celles-ci.

Les thermoblocs 3a,3b,3c sont portés aux trois températures correspondant aux trois températures des phases de l'ACP (ou à des températures légèrement supérieure compte tenu des éventuelles déperditions thermiques entre la platine chauffante 3 et la plaque 1) et les moyens de déplacement 4 sont mis en œuvre de façon à animer d'un mouvement giratoire la plaque 1 pour faire passer

successivement et autant de fois que désiré chaque chambre réactionnelle au dessus des trois thermoblocs.

Plus précisément le bloc 3a est porté à la température correspondant à la phase de dénaturation (94°C), le thermobloc 3b est porté à la température correspondant à la phase d'hybridation (36°C) et le thermobloc 3c est porté à la température correspondant à la phase d'élongation (72°C).

Dans le présent mode de réalisation, le micromoteur 7 des moyens de déplacement 4 est conçu pour inculquer une rotation de 10 degrés toutes les 2,5 secondes à la plaque 1 (soit un cycle d'ACP en 1,5 mn). Toutefois dans d'autres modes de réalisation, ce mouvement pourra présenter une vitesse différente et être continu au lieu d'être saccadé.

On notera que le dispositif optique 9 est prévu au dessus du bloc correspondant 3c porté à une température correspondant à la température d'élongation, et plus particulièrement à un emplacement qui correspond à la fin de la phase d'élongation.

Le système présenté permet de remplir rapidement et de façon reproductible une grande quantité de chambres réactionnelles et d'effectuer sur le contenu de celles-ci une ACP et des mesures de fluorescence à chaque cycle de l'ACP.

Le mode de réalisation ici décrit n'a pas pour objet de réduire la portée de l'invention. Il pourra donc y être apporté de nombreuses modifications sans sortir du cadre de celle-ci

REVENDICATIONS

1. Système d'amplification en chaîne par polymérase de séquences nucléiques cibles caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - au moins une plaque (1) présentant une pluralité de chambres réactionnelles (10) ; et,
- au moins une platine de chauffage (3) présentant trois zones distinctes pouvant être portées à trois températures différentes, correspondant aux trois phases des cycles d'amplification en chaîne par polymérase (ACP).

10 2. Système selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins une plaque (1) présentant au moins un réservoir (2) destiné à recevoir un fluide composé de notamment l'échantillon d'ADN à analyser et des réactifs nécessaires à une réaction d'amplification en chaîne à l'exception des amorces, une pluralité de chambres réactionnelles (10) dans lesquelles sont pré-réparties des amorces spécifiques de séquences
- 15 cibles à amplifier, et des canaux (11) reliant ledit réservoir auxdites chambres réactionnelles ;
- au moins une platine de chauffage (3) présentant trois zones distinctes pouvant être portées à trois températures différentes, correspondant aux trois phases des cycles d'ACP ;
- des moyens de déplacement (4) relatifs entre ladite plaque et ladite platine.

3. Système selon la revendication 2 caractérisé en ce que ladite plaque (1) présente une

20 forme circulaire, ledit réservoir (2) étant prévu sensiblement au centre de ladite plaque, lesdites chambres réactionnelles (10) étant réparties en cercle autour dudit réservoir (2), et lesdits canaux (11) reliant ledit réservoir auxdites chambres étant prévus essentiellement radialement.

4. Système selon la revendication 3 caractérisé en ce que lesdites chambres réactionnelles

25 (10) sont prévues à la périphérie de ladite plaque.

5. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 4 caractérisé en ce qu'il comprend autant de canaux (11) que de chambres réactionnelles (12).

6. Système selon l'une quelconque des revendications 3 à 5 caractérisé en ce que lesdites zones distinctes de chauffage de ladite platine de chauffage (3) sont réparties selon

30 trois portions de disque.

7. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 6 caractérisé en ce que ladite platine de chauffage (3) est fixe et en ce que ladite plaque (1) est mue grâce auxdits moyens de déplacement.
8. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 7 caractérisé en ce que ladite plaque est fixe et en ce que ladite platine de chauffage est mue grâce auxdits moyens de déplacement.
9. Système selon l'une des revendications 2 à 8 caractérisé en ce que lesdits moyens de déplacement (4) autorisent la mise en rotation de ladite plaque (1) et/ou de ladite platine de chauffage (3).
10. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 9 caractérisé en ce qu'il comprend de plus des moyens permettant d'amener sous pression le fluide présent dans ledit réservoir dans lesdites chambres réactionnelles.
11. Système selon la revendication 10 caractérisé en ce que lesdits moyens d'amenée incluent un dispositif à piston (7).
12. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 11 caractérisé en ce que ledit réservoir (2) présente une capacité comprise entre environ 0,1 ml et environ 1 ml.
13. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 12 caractérisé en ce qu'il comprend entre environ 20 et environ 500 chambres réactionnelles (10).
14. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 13 caractérisée en ce que lesdites chambres réactionnelles (10) présentent un volume compris entre environ 1 μ l et 10 μ l.
15. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 14 caractérisé en ce que lesdits canaux (11) présentent un diamètre inférieur ou égal à environ 0,2 mm.
16. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 caractérisée en ce que lesdites chambres réactionnelles (10) présentent une profondeur comprise entre environ 0,5 mm et 1,5 mm.
17. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 16 caractérisé en ce que ladite plaque (1) présente un diamètre compris entre environ 1 et 10 cm.
18. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 17 caractérisé en ce que ladite plaque (1) présente une épaisseur comprise entre 0,5 et 5 mm.

19. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 18 caractérisé en ce que ladite plaque (1) est en matière plastique.
20. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 19 caractérisé en ce que ladite plaque (1) est en contact direct avec ladite platine chauffante (3).
- 5 21. Système selon la revendication 2 à 20 caractérisé en ce que ladite platine est pourvue d'un revêtement favorisant le déplacement entre ladite plaque et ladite platine.
22. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 21 caractérisée en ce que le plancher desdites chambres réactionnelles (10) présente une épaisseur d'environ 0,2mm.
23. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 22 caractérisé en ce que
10 ledites chambres réactionnelles (10) sont pourvues d'évents (12).
24. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 23 caractérisé en ce que lesdites chambres réactionnelles (10) sont fermées par une paroi supérieure transparente(13).
25. Système selon l'une quelconque des revendications 1 à 24 caractérisé en ce que ladite platine chauffante (3) inclut trois thermoblocs distincts (3a,3b,3c) reliés à des moyens de
15 programmation de leur température.
26. Système selon l'une quelconque des revendications 1 à 25 caractérisé en ce que ladite plaque (1) présente au moins une oreille (6) et en ce que lesdits moyens de déplacement (4) incluent au moins un axe(5) coopérant avec ladite oreille (6) pour inculquer à ladite plaque (1) un mouvement rotatif.
- 20 27. Système selon l'une quelconque des revendications 2 à 26 caractérisé en ce que lesdites chambres réactionnelles (10) contiennent chacune deux amorces spécifiques d'une la séquence cible à amplifier et, facultativement, au moins un sonde marquée spécifique de ladite séquence.
28. Système selon l'une quelconque des revendications 1 à 27 caractérisé en ce qu'il
25 comprend de plus des moyens optique (9) d'excitation/mesure de la fluorescence prévue au-dessus de ladite plaque.
29. Procédé d'amplification en chaîne par polymérase grâce à un système selon l'une quelconque des revendications 2 à 28 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistants à :

- remplir au moins partiellement le réservoir avec un fluide contenant un échantillon d'acides nucléiques à analyser ainsi que tout le nécessaire à une réaction d'amplification, à l'exception des amorces, et facultativement un intercalant fluorescent des acides nucléiques;
 - répartir ledit fluide dans lesdites chambres réactionnelles prévues dans ladite plaque dans
- 5 lesquelles sont préréparties des amorces et facultativement une ou plusieurs sondes marquées spécifiques de la séquence nucléique cible;
- mettre en œuvre lesdits moyens de déplacement relatifs entre la plaque et la platine chauffante pour amener successivement et autant de fois que désiré le contenu de chaque
- chambre aux trois températures définies par les trois zones de ladite platine de chauffage.
- 10 30. Platine de chauffage (3) pour système d'amplification en chaîne par polymérase de séquences nucléiques cibles caractérisé en ce qu'elle présente trois zones distinctes pouvant être portées à trois températures différentes, correspondant aux trois phases des cycles d'amplification en chaîne par polymérase (ACP).
31. Platine de chauffage (3) selon la revendication 30 caractérisé en ce qu'elle présente
- 15 trois thermoblocs distincts (3a,3b,3c) reliés à des moyens de programmation de leur température.

1/2

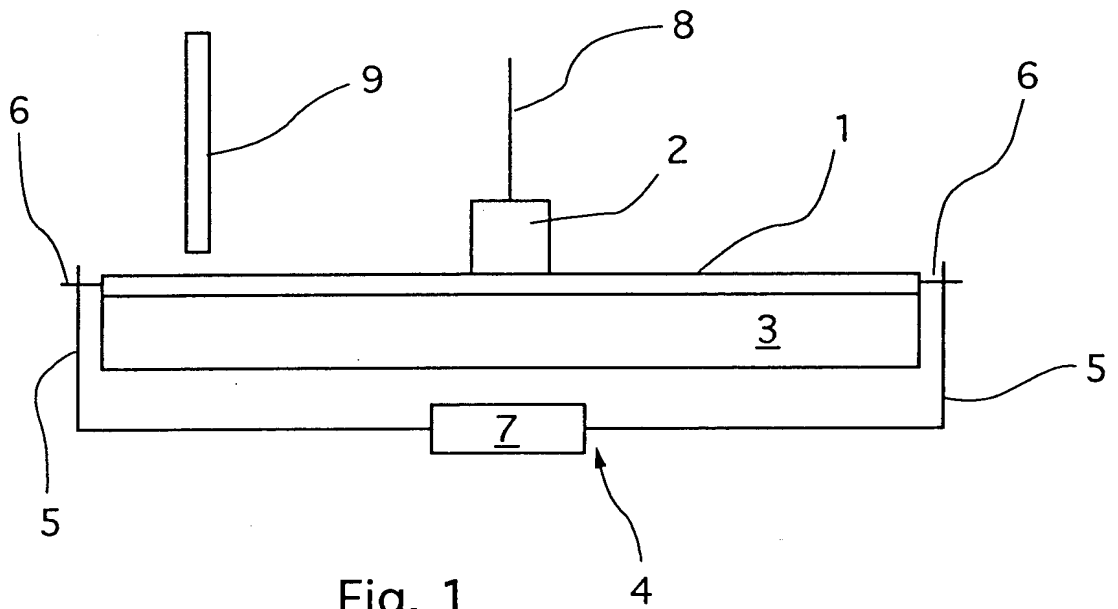


Fig. 1

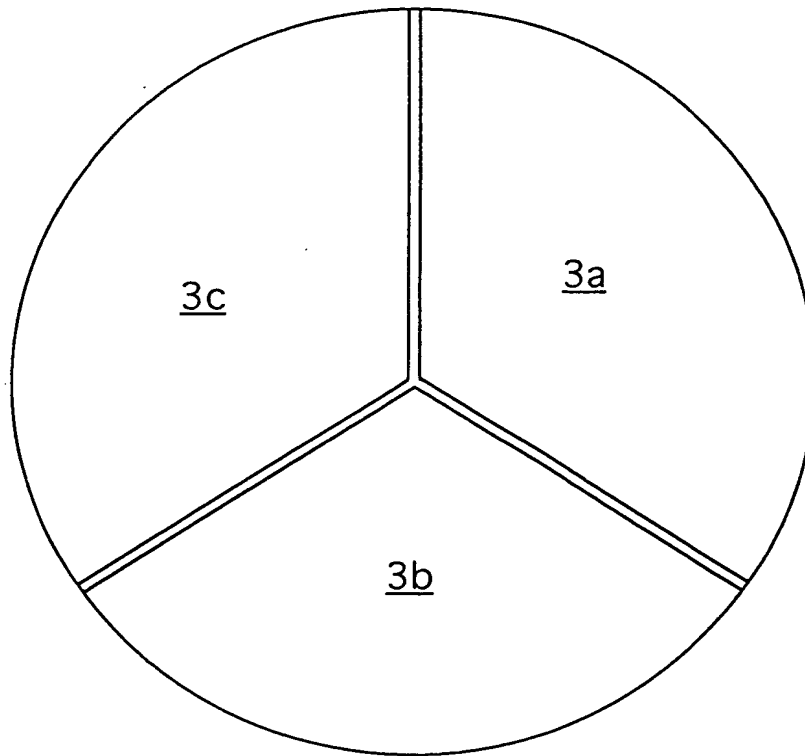


Fig. 2

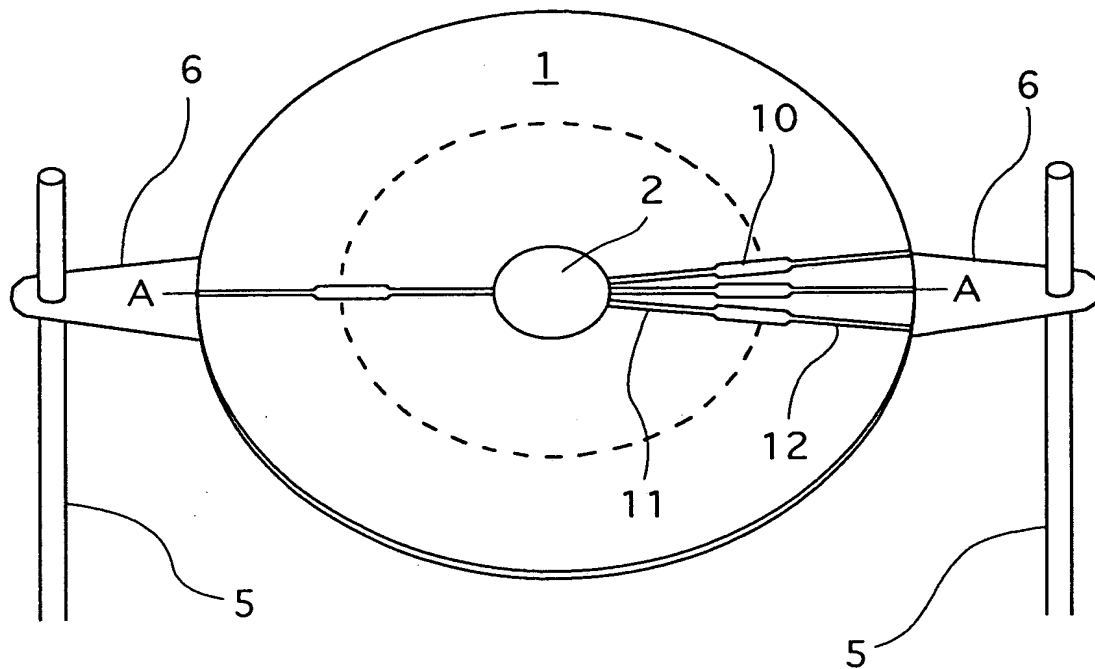


Fig. 3

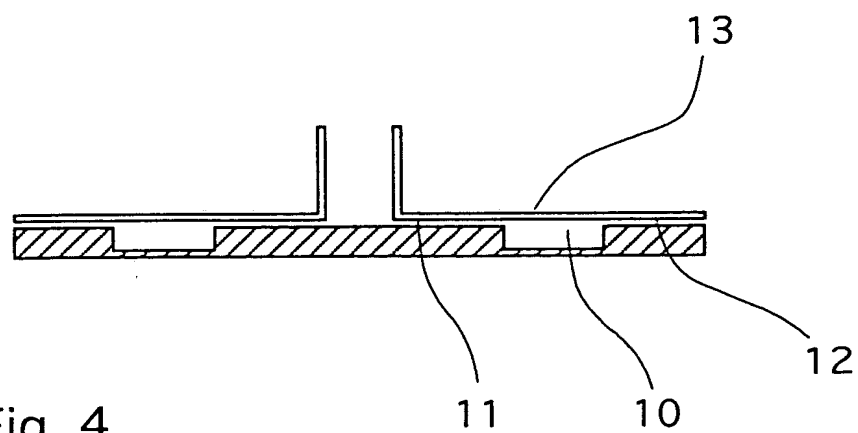


Fig. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)



INPI

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

REÇU LE

13 JUL. 2001

E. GUTMANN - Y. PLASSERAUD S.A.

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD SA

3 RUE CHAUVÉAU LAGARDE
75008 PARISDEMANDE DE : BREVET
N° : 0010029000 DU 28/07/00
V/REF. : B4898-FL/SDU

PARIS, LE 12 JUILLET 2001

OBJET : NOTIFICATION D'UN RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE
AVEC REPONSE OBLIGATOIRE12/7
↓
12/10

Messieurs,

J'ai l'honneur de vous adresser, en annexe, le rapport de recherche préliminaire établi conformément à l'article R.612-57 du code de la propriété intellectuelle, citant les documents qui peuvent être pris en considération pour apprécier la nouveauté et l'activité inventive de l'invention, objet de votre demande.

Selon l'article R.612-59 du code précité, vous disposez d'un délai de **3 mois** à compter de la date de réception de ce rapport de recherche préliminaire pour y répondre par écrit. Avant l'expiration de ce délai, celui-ci peut être renouvelé une fois sur votre requête.

Suivant la catégorie des documents cités, vous pouvez être tenu à une obligation de réponse (par exemple, si le rapport de recherche préliminaire mentionne des documents de catégorie **X ou Y**). Dans ce cas, un papillon **rouge** est apposé sur cette lettre et le défaut de réponse entraînera le rejet de la demande. Dans le cas contraire, ce papillon est **jaune**.

Dans tous les cas, il est de votre intérêt en élaborant votre réponse, de tenir compte de tous les documents cités.

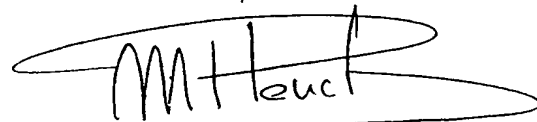
Selon les articles R.612-58 et R.612-60 du code précité, votre réponse peut consister :

- soit en de nouvelles revendications (en 3 exemplaires). Dans ce cas, vous devez signaler les changements apportés aux revendications initiales. Vous pouvez y joindre des observations qui mettent en évidence les caractéristiques techniques de ces nouvelles revendications qui échappent à l'opposabilité des antériorités citées.
- soit seulement en des observations qui ont alors pour objet de discuter l'opposabilité des antériorités citées.

Veuillez agréer l'expression de ma considération distinguée.

Pour le Directeur général de l'Institut national
de la propriété industrielle

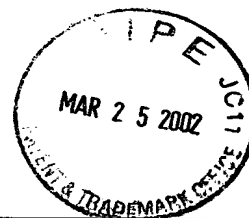
Le Chef du département des brevets



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLESIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Ernst & Young
①

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

18 OCT. 2001

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

M. H. Leuc

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)